

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

ГОЛОДНЯК
Наталья Евгеньевна

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ТРАНСФЕКЦИИ И ТРАНСДУКЦИИ
КЛЕТОК ЭУКАРИОТ

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент Т.В. Романовская

Минск, 2025

РЕФЕРАТ

Дипломная работа содержит 59 страниц, 30 рисунков, 2 таблицы, 38 использованных источников.

Ключевые слова: ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ, ЛЕНТИВИРУСНЫЙ ВЕКТОР, ТРАНСФЕКЦИЯ, ТРАНСДУКЦИЯ, ПОЛИЭТИЛЕНИМИН, ОПТИМИЗАЦИЯ, НЕК-293Т, KASUMI-1.

Объект исследования: методы трансфекции и трансдукции клеток человека.

Цель работы: определение оптимальных условий при проведении трансфекции и трансдукции для наиболее эффективного введения генетического материала в эукариотические клетки.

Методы исследования: методы работы с клеточными культурами, методы генетической модификации клеток человека, молекулярно-генетические методы.

Полученные результаты: Были проанализированы различные параметры трансфекции, такие как концентрация реагента трансфекции и плазмидной ДНК, день сбора после проведения трансфекции. Оптимизация процесса трансдукции заключалась в создании условий для получения высокого титра рекомбинантных вирусов, за счет подбора условий концентрирования вирусных частиц.

Было определено, что количество полиэтиленимина и плазмидной ДНК, вносимых для проведения трансфекции не определяется только их массовым соотношением. Минимальная концентрация добавляемого в раствор реагента полиэтиленимина должна составлять 2 мкг/мл. При этом, концентрация полиэтиленимина выше 3 мкг/мл токсична для клеток. Кроме того, хранение раствора полиэтиленимина при -20°C в течении года отрицательно сказывается на его способность эффективно трансфецировать клетки. Сбор модифицированных клеток рекомендовано проводить после 72 ч инкубации с трансфецирующим раствором.

Для трансдукции было установлено время, за которое вирусные частицы способны к максимальной концентрации методом центрифугирования. Время соответствует 3 часам на скорости 16000 g. Также удалось определить, что процесс спинокуляции не влияет на эффективность трансдукции клеток линии *Kasumi-1* вне зависимости от того, сколько времени отводилось на его осуществление.

Полученные результаты позволят обеспечивать высокую эффективность при выполнении задач по генетической модификации клеток человека.

РЭФЭРАТ

Дыпломная праца ўтрымлівае 59 старонак, 30 малюнка, 2 табліц, 38 выкарыстаных крыніц.

Ключавыя словы: ГЕННАЯ ІНЖЭНЕРЫЯ, ЛЕНТЫВІРУСНЫ ВЕКТАР, ТРАНСФЕКЦЫЯ, ТРАНСДУКЦЫЯ, ПОЛІЭТЫЛЕНІМІН, АПТЫМІЗАЦЫЯ, НЕК-293Т, KASUMI-1.

Аб'ект даследавання: метады трансфекцыі і трансдукцыі клетак чалавека.

Мэта працы: вызначэнне аптымальных умоў пры правядзенні трансфекцыі і трансдукцыі для найбольш эфектыўнага ўвядзення генетычнага матэрыялу ў эукарыятычнай клеткі.

Метады даследавання: метады працы з клеткавымі культурамі, метады генетычнай мадыфікацыі клетак чалавека, малекулярна-генетычныя метады.

Атрыманыя вынікі: Былі прааналізаваны розныя параметры трансфекцыі, такія як канцэнтрацыя рэагента трансфекцыі і плазміднай ДНК, дзень збору пасля правядзення трансфекцыі. Аптымізацыя працэсу трансдукцыі заключаўся ў стварэнні ўмоў для атрымання высокага тытра рэкамбінантных вірусаў, за кошт падбору ўмоў канцэнтравання вірусных часціц.

Было вызначана, што колькасць поліэтыленіміну і плазміднай ДНК, якія ўносяцца для правядзення трансфекцыі не вызначаецца толькі іх масавым суадносінамі. Мінімальнае канцэнтрацыя дадаванага ў раствор рэагента поліэтыленіміну павінна складаць 2 мкг/мл. Пры гэтым, канцэнтрацыя поліэтыленіміну вышэй за 3 мкг / мл таксічная для клетак. Акрамя таго, захоўванне раствора поліэтыленіміна пры -20 °С на працягу года адмоўна уплывае на яго здольнасць эфектыўна трансфекцыраваць клеткі. Збор мадыфікаваных клетак рэкамендавана праводзіць пасля 72 г інкубацыі з трансфекцыруючым раствором.

Для трансдукцыі быў устаноўлены час, за які вірусныя часціцы здольныя да максімальнай канцэнтрацыі метадам цэнтрыфугавання. Час адпавядае 3 гадзінам на хуткасці 16000 g. Таксама атрымалася вызначыць, што працэс спінакуляцыі не ўплывае на эфектыўнасць трансдукцыі клетак лініі Kasumi-1 незалежна ад таго, колькі часу адводзілася на яго ажыццяўленне.

Атрыманыя вынікі дазваляць забяспечваць высокую эфектыўнасць пры выкананні задач па генетычнай мадыфікацыі клетак чалавека.

ABSTRACT

The thesis contains 59 pages, 30 figures, 2 tables, 38 references.

Keywords: GENETIC ENGINEERING, LENTIVIRAL VECTOR, TRANSFECTION, TRANSDUCTION, POLYETHYLENEIMINE, OPTIMIZATION, HEK-293T, KASUMI-1.

Research object: methods of transfection and transduction of human cells.

Objective: determining the optimal conditions for transfection and transduction for the most effective introduction of genetic material into eukaryotic cells.

Research methods: methods of working with cell cultures, methods of genetic modification of human cells, molecular genetic methods.

Results: Various transfection parameters, such as the concentration of the transfection reagent and plasmid DNA, and harvesting time, were analyzed. Optimization of the transduction process consisted in creating conditions for obtaining a high titer of recombinant viruses by selecting the conditions for concentrating viral particles.

It was determined that the amount of polyethyleneimine and plasmid DNA introduced for transfection is not determined only by their mass ratio. The minimum concentration of the polyethyleneimine reagent added to the solution should be 2 µg/ml. At the same time, the concentration of polyethyleneimine above 3 µg/ml is toxic to cells. In addition, storing the polyethyleneimine solution at -20°C for a year negatively affects its ability to effectively transfect cells. It is recommended to collect modified cells after 72 hours of incubation with the transfection solution.

For transduction, the time during which viral particles are capable of maximum concentration by centrifugation was determined. The time corresponds to 3 h at a speed of 16000 g. It was also possible to determine that the spinoculation process does not affect the efficiency of transduction of Kasumi-1 cells, regardless of how much time was allocated for its implementation.

The obtained results will ensure high efficiency in performing tasks on genetic modification of human cells.